



⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

LITERATUR

⑪ Anmeldenummer: 81105956.7

⑤ Int. Cl.³: G 01 N 33/48

⑫ Anmeldetag: 29.07.81

G 01 N 33/52, A 61 K 35/14
C 12 Q 1/00, B 01 L 3/14
B 01 D 39/20

③ Priorität: 05.08.80 DE 3029579

⑦ Anmelder: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
Sandhofer Strasse 112-132 Postfach 31 01 20
D-6800 Mannheim 31-Waldhof(DE)④ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
10.02.82 Patentblatt 82 6⑦ Erfinder: Vogel, Peter, Dr.rer.nat.
Schubertweg 5
D-6944 Hemsbach(DE)⑧ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE⑦ Erfinder: Braun, Hans-Peter, Dr.rer.nat.
Rainweg 103
D-6900 Heidelberg 1(DE)⑦ Erfinder: Berger, Dieter, Dr.rer.nat.
Bensheimer-Strasse 45
D-6806 Viernheim(DE)⑦ Erfinder: Werner, Wolfgang, Dr.rer.nat.
Meissener Weg 39
D-6800 Mannheim-Vogelstang(DE)

⑤ Mittel zur Abtrennung von Plasma oder Serum aus Vollblut.

⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Abtrennen von Plasma oder Serum aus Vollblut, wobei man das Blut langsam durch eine Schicht aus Glasfasern mit einem mittleren Durchmesser von 0,2 - 5 μ und einer Dichte von 0,1 - 0,5 g cm³ sickern läßt und das ablaufende Plasma gewinnt, wobei das Volumen des abzutrennenden Plasmas oder Serum höchstens 50 %, vorzugsweise weniger als 30 % vom Saugvolumen der Glasfaserschicht beträgt, sowie Mitteln zur Durchführung des Verfahrens.

EP 0 045 476 A1

Mittel zur Abtrennung von Plasma oder Serum aus Vollblut

In der Klinischen Chemie ist die Abtrennung von Serum oder Plasma aus Blut von überragender . Bedeutung, da praktisch nur aus diesen beiden die Analyse von gelösten Blutbestandteilen störungsfrei durchgeführt werden kann.

Die normale und gebräuchlichste Form der Abtrennung von Serum oder Plasma von den Erythrozyten ist die Zentrifugation. Diese ist jedoch insbesondere bei der Verwendung kleiner Probenmengen problematisch, auch ist die Trennung von Überstand und Blutkuchen nicht immer einfach, so daß hierfür eine ganze Reihe von Hilfsmitteln in der Literatur zu finden sind, z.B. DE-AS 25 59 242.

Von besonderer Problematik ist die Verwendung von Vollblut bei Schnelldiagnostica. Schnelldiagnostica sind reagentienhaltige saugfähige oder quellbare Träger, vorzugsweise aus Filterpapier, auf die eine geringe Menge, z.B. ein Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit aufgebracht wird und bei denen aufgrund der überwiegend sehr kurzen Reaktion eine Farbänderung eintritt, die entweder visuell bewertet wird oder remissionsphotometrisch ausgemessen wird. Da trübe und gefärbte Lösungen wie Blut die Ablesung stören, hat es daher nicht an Versuchen gefehlt, Schnelldiagnostica für die direkte Verwendung von Vollblut zugänglich zu machen. Hierbei sind z.B. zu nennen das Überziehen von Testpapieren mit semipermeablen Membranen (US-P 3 092 465) und die Ver-

wendung von wasserquellbaren Filmen, in die nur die gelösten Bestandteile des Blutes, nicht aber die Erythrozyten eindringen können (DE-AS 15 98 153). Diese beiden Verfahren sind an sich brauchbar, allerdings nur bei

5 Testen für niedermolekulare Bestandteile des Blutes, wie z.B. Glucose oder Harnstoff; höhermolekulare Bestandteile des Blutes, wie z.B. Lipide oder die an Serum-Protein gebundenen Substrate wie z.B. Bilirubin, können auf diese Weise nicht bestimmt werden, weil sie nicht in der Lage

10 sind, in den Film einzudringen bzw. durch die semipermeable Membran hindurchzugelangen. Weiterhin sind Vorschläge bekannt geworden, diagnostische Mittel zum Abtrennen der Blutzellen mit Membranfiltern zu bedecken (DE-AS 22 22 951 und DE-OS 29 22 958). Der Nachteil dieser diagnostischen

15 Mittel ist, daß durch Membranfilter das Blut nur sehr langsam und in geringer Menge durchdringen kann, weil sie leicht verstopfen und die Reaktion entsprechend lange dauert. Im Gegensatz zu den vorher genannten diagnostischen Mitteln, die bereits im Handel sind, sind "Schnellteste" der zuletzt

20 geschilderten Art deshalb noch nicht im Handel erschienen.

Aus den DE-OS 29 08 721 und 29 08 722 ist weiterhin bekannt, daß man Lymphozyten beziehungsweise Leukozyten aus Blut abtrennen kann, wenn man das Blut über eine Schicht aus Kunstfasern mit mittleren Faserdurchmessern von 5 - 20 μ beziehungsweise 3 - 10 μ filtrierte. Da die Erythrozyten aber

25 überwiegend mit dem Plasma durch den Filter laufen, sind diese Filter nicht geeignet zur Gewinnung von Plasma. Rein spekulativ werden darüber hinaus Kohlenstofffasern, Glasfasern und Metallfasern genannt.

30

Aufgabe der Erfindung war es daher, ein einfaches Mittel zum Abtrennen von Plasma oder Serum aus Vollblut zu finden, das ohne Zentrifugieren rasch und sicher kleine Mengen Blut trennt und insbesondere als Probenvorbereitung für diagnostische Zwecke geeignet ist.

Es wurde nun gefunden, daß die Abtrennung von Plasma bzw. Serum aus Vollblut schnell und einfach und in genügender Menge erfolgt, wenn man das Blut durch eine Schüttung aus Glasfasern allein oder in Mischung mit anderen Fasern strömen läßt. Diese Tatsache muß umsomehr als überraschend angesehen werden, als in der oben erwähnten DE-AS 22 22 951 die Verwendung von Glasfasermatten zur Abtrennung von weißen Blutzellen schon beschrieben ist, jedoch für die Abtrennung der Erythrozyten die zusätzliche Verwendung von Membranfiltern als unbedingt notwendig gefordert wird.

Die Erfindung ist in den Ansprüchen näher gekennzeichnet.

Die Glasfasern können lose gestapelt, sowie in Form von Papieren, Vliesen oder Filzen, aber auch gehalten durch eine äußere Form in jeder gewünschten Gestalt Verwendung finden.

Die so gestalteten Glasfasern können als Abdeckung für eines der oben beschriebenen Schnell Diagnostica dazu dienen, daß dieses diagnostische Mittel, für dessen Verwendung bisher die vorherige Gewinnung von Serum oder Plasma notwendig war, jetzt für die direkte Verwendung von Vollblut geeignet ist.

Weiterhin können mit Glasfasern gefüllte Säulen, Filternutschen oder andere geeignete Gefäße auch dazu verwendet werden, durch einfaches Durchlaufen von Blut Serum oder Plasma ohne Zentrifugation zu gewinnen und diese in geeigneter Weise für diagnostische Mittel bereitzustellen, da das Serum bzw. Plasma schneller durch eine solche Schicht durchläuft, als die Erythrozyten und Leucozyten.

Die oben genannten Glasfasern können aus Fasern unterschiedlichen Durchmessers bestehen. Das Glasmaterial kann aus alkalihaltigem oder alkalifreiem Borosilikatglas, aber auch aus reinem Quarzglas bestehen. Fasermaterial aus anderen technischen Gläsern, z.B. borfreien Alkaligläsern, Kristallglas, Bleiglas u.a. befinden sich in den notwendigen Abmessungen der Fasern nicht im Handel und konnten daher nicht untersucht werden. Es wird aber davon ausgegangen, daß auch sie geeignet sind. Der mittlere Durchmesser der Glasfasern kann zwischen $0,2\mu$ bis etwa 5μ , vorzugsweise aber zwischen $0,5\mu$ und $2,5\mu$, insbesondere zwischen $0,5$ und $1,5\mu$, liegen. Die Faserdurchmesser können entsprechend der Herstellung stark streuen, sollten jedoch eine Obergrenze von ca. 10μ nur ausnahmeweise überschreiten. Ihre Länge ist nur durch die Art der Stapelung begrenzt, hat aber ansonsten keinen Einfluß. Je nach Art der Stapelung werden Dichten von $0,1 - 0,5$, üblicherweise $0,2 - 0,4 \text{ g/cm}^3$ gefunden.

Weiterhin können die Glasfasern untereinander, aber auch mit Fasern aus anderen Materialien, vermischt werden, wodurch der innere Zusammenhalt der Fasern verbessert werden kann. Geeignet sind z.B. synthetische Fasern wie Polyester, Polyamid u.a., aber auch Fasern aus Polyethylen, Polypropylen und anderen nachträglich durch Wärme verformbaren Kunststoffen. Die Zusätze können auch höhere ($10 - 20\mu$) Durchmesser aufweisen, so lange ihre Menge nicht so groß ist, daß sie die Abtrennung durch die erfindungsgemäßen, feineren Glasfasern beeinflussen.

Weiterhin können die Glasfasern durch Zusatz von anorganischen Bindemitteln (z.B. Wasserglas) oder organischen Bindemittel (z.B. Polyvinylacetat, Polyvinylpropionat, Polyacrylsäureester u.a.) verfestigt werden, durch die die Glasfasern an den Berührungsstellen verklebt werden.

Besonders bevorzugt ist die Kombination der erfindungsgemäßen Glasfaserschichten mit diagnostischen Mitteln, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist.

Die Glasfasern können in diesen diagnostischen Mitteln auch Reagenzien enthalten, die die Hämolyse der Erythrozyten verhindern, ferner Reagenzien, die die Gerinnung hemmen oder fördern sowie Reagenzien, die in der Indikatorschicht benötigt werden, mit den dortigen Reagenzien aber unverträglich sind. Diese letzteren Reagenzien können natürlich auch in allen Schichten untergebracht werden, die zwischen Glasfaser und Indikatorschicht liegen.

Den Aufbau eines solchen erfindungsgemäßen diagnostischen Mittels erläutert Fig. 1. Auf einer steifen Unterlage 2 ist die Reaktionsschicht 1 des Schnelldiagnosticums aufgeklebt. Dicht über der Reaktionsschicht ist eine dünne, für Flüssig-

5 keiten durchlässige formstabile Trennschicht 4 aufgebracht, die aus einem Netzwerk aus gewebten oder verfilzten Kunststoff-Fäden besteht und die auf beiden Seiten der Reaktionsschicht in leicht lösbarer Weise auf die Grund-

10 folie in der Art geklebt ist, daß ein leicht zu fassender Griff 4a am längeren Teil der Unterlage freibleibt. Oberhalb der Reaktionsschicht ist nun das Glasfaserpapier 3 aufgebracht. Dieses wird durch ein weiteres Netzwerk 5 in seiner Lage fixiert, das wie die Trennschicht 4 oberhalb und unterhalb der Reaktionsschicht angeklebt ist.

15 Die Reaktionsschicht 1 kann aus einem imprägnierten saugfähigen Träger oder quellbarem oder porösem Kunststoff-film bestehen. Als Unterlage 2 dient vorzugsweise eine dickere Kunststoffolie, ein fester Karton, eine Glasplatte

20 oder ein anderes stabiles Trägermaterial.

Nach Aufbringen eines Bluttröpfens 8 auf die obere Seite des Schnelldiagnosticums wird im Glasfaserpapier das Plasma von den Erythrozyten und Leucozyten abgetrennt. Das auf

25 diese Weise abgetrennte Plasma gelangt über die Trennschicht 4 in die Reaktionszone 1 des diagnostischen Mittels. Nach einer angemessenen Zeit, in der das Plasma in die Reaktionszone eingedrungen ist, wird die Trennschicht an ihrem freien Ende ergriffen und mit dem Glasfaserpapier

30 und dem Netzwerk 5 abgetrennt. Anschließend kann die Reaktionsschicht, in der nun die Nachweisreaktion stattfindet, visuell oder remissionsphotometrisch ausgewertet werden.

35 Einen weiteren möglichen Aufbau des erfindungsgemäßen Schnelldiagnosticums verdeutlicht Fig. 2, wobei zusätzlich zu dem oben beschriebenen Aufbau eine oder mehrere für

Flüssigkeiten aller Art durchlässige Schichten 6 in der Art aufgebracht sind, daß sie entweder oberhalb (Fig. 2a) oder unterhalb (Fig. 2b) der Glasfaserpapiere zu liegen kommen. Diese zusätzlichen Schichten können mit Reagenzien imprägniert sein, die entweder leicht löslich sind und zusammen mit dem Plasma in die Reaktionszone gelangen oder aber weniger löslich sind und eine oder mehrere Vorstufen der Nachweisreaktion bereits außerhalb der endgültigen Reaktionszone 1 ablaufen lassen.

In Fig. 3 wird ein anderer Aufbau (Fig. 3a Seitenansicht, Fig. 3b Aufsicht) des erfindungsgemäßen Schnelldiagnosticum beschrieben, bei dem das Glasfaserpapier 3 direkt auf die Unterlage 2 aufgeklebt ist. Auf einen Teil des Glasfaserpapiers ist die Reaktionsschicht 1 aufgebracht. Auf den freibleibenden Teil des Glasfaserpapiers wird das Blut 8 aufgetragen. Das sich im Glasfaserpapier von den Erythrozyten abtrennende Plasma diffundiert im Glasfaserpapier zu der Reaktionsschicht und in diese hinein. Die bei der Reaktion entstehenden Reaktionsfarben können von der Oberseite des Schnelldiagnosticum beobachtet und ausgewertet werden. Die Reaktionsschicht kann direkt durch Bedrucken oder Beschichten auf das Glasfaserpapier aufgebracht werden. Sie kann aber auch in Form eines ganz- oder teilimprägnierten saugfähigen Trägers auf das Glasfaserpapier aufgeklebt werden.

Weiterhin kann, wie in Fig. 4 und Fig. 5 beschrieben, das erfindungsgemäße diagnostische Mittel so aufgebaut sein, daß auf der Unterlage 2 zuerst ein saugfähiges Material 9 wie z.B. Cellulosepapier oder ein Kunststoffvlies und oberhalb dieses Materials das Glasfaserpapier 3 und die Reaktionsschicht 1 aufgeklebt sind. Dabei kann das saug-

fähige Material 9 die gleiche Fläche wie die Reaktionsschicht
einnehmen (Fig. 5) oder aber eine größere Fläche, so daß
das Material 9 eine Fläche freiläßt (Fig. 4). Das Blut wird
auf die freibleibende Fläche des saugfähigen Materials
5 (Fig. 4) oder direkt neben das saugfähige Material (Fig. 5)
aufgetropft und von diesem schnell aufgenommen und unter
das Glasfaserpapier gesaugt. Anschließend wird durch die
Saugfähigkeit des Glasfaserpapiers Blut durch das Glas-
faserpapier nach oben gesaugt, wobei die Abtrennung der
10 Erythrozyten erfolgt und Plasma in die Reaktionsschicht 1 ge-
langt. Die Reaktion wird wie in Fig. 3 von der Oberseite
des Schnelldiagnosticums beobachtet.

Fig. 6 zeigt einen weiteren Aufbau eines für die direkte
15 Verwendung von Vollblut geeigneten Schnelldiagnosticums.
Dieses ist so aufgebaut, daß auf der steifen Unterlage 2
nebeneinander eine saugfähige Schicht 9, die z.B. aus
einem Cellulosepapier oder aus einem cellulosehaltigen
Kunstfaservlies besteht und eine Glasfaserschicht 3 aufge-
20 bracht sind. Die beiden Schichten sollen einen engen Kon-
takt aufweisen. Auf der Oberfläche der saugfähigen Schicht 9
befinden sich die für das Schnelldiagnosticum notwendigen
Nachweisreagenzien, die z.B. durch Beschichten mit einem
offenen Film gemäß DE-OS 29 10 134 aufgebracht sein können.
25 Beim Auftragen des Blutropfens auf die von der Reaktions-
zone entferntere Seite der Glasfaserschicht findet die
Trennung Plasma-Erythrozyten so statt, daß zuerst das Plasma
mit seiner Front an der Trennstelle zu der saugfähigen
Schicht 9 anlangt und sofort von dieser aufgesaugt wird.
30 Durch Kapillarkräfte gelangt dann das Plasma in die
Reaktionsschicht 1, wo sich die Nachweisreaktion z.B. durch
eine von oben sichtbare Farbveränderung bemerkbar macht.

Weiterhin kann das erfindungsgemäße diagnostische Mittel in der in Fig. 7 beschriebenen Form hergestellt werden. Dabei wird das Glasfaserpapier 3 auf eine Unterlage 2 aufgeklebt. Die Unterlage hat an der Berührungs-
5 stelle ein oder mehrere Löcher 11. Auf der anderen Seite ist eine Reaktionsschicht 1 direkt oder durch Kleben auf das Glasfaserpapier aufgebracht. Das Blut 8 wird so auf das diagnostische Mittel aufgebracht, daß es durch das Loch (oder die Löcher) auf das Glas-
10 faserpapier 3 gelangen kann. Das im Glasfaserpapier abgetrennte Plasma trifft nun auf die Reaktionsschicht 1 und führt zu der Reaktion, die visuell oder remissionsphotometrisch an deren Oberfläche ausgewertet werden kann. Die Reaktionsschicht ist dabei durch eine durchsichtige Ab-
15 deckschicht 7 geschützt.

Die Reaktionsschicht 1 kann sowohl aus einer, z.B. auf die Glasfasermatte aufgedruckten Schicht bestehen, sie kann aber auch aus einem mehrschichtigen Element bestehen, bei dem die Schichten verschiedene Reagenzien
20 enthalten können und/oder mehrere Funktionen erfüllen können, wie z.B. in der DE-OS 29 22 958 beschrieben.

Fig. 8a zeigt in der Seitenansicht und Fig. 8b zeigt in der Aufsicht einen weiteren Aufbau eines solchen erfindungsgemäßen diagnostischen Mittels, bei dem
25 die aus Glasfasern bestehende Trennschicht 3 sowie eine oder mehrere für die Reaktion notwendigen Schichten 6 durch eine vorgefertigte Form 12 zusammengehalten werden. Das Blut wird hierbei auf die Seite
30 des Glasfaserfilters aufgetropft. Das abgetrennte

Plasma gelangt anschließend in die Reaktionsschicht 1 wobei die Indikatorreaktion auf der dem Glasfaserfilter gegenüberliegenden Seite visuell oder remissionsphotometrisch ausgewertet wird.

5

Aus zeichentechnischen Gründen sind in einigen Figuren die verschiedenen Schichten teilweise mit einem Zwischenraum gezeichnet. In der praktischen Ausführung liegen die Schichten aufeinander, so daß Flüssigkeiten ungehindert übertreten können. Weiterhin sind die Reaktionsschichten 1 und 6 querunterteilt, um anzudeuten, daß sie auch aus mehreren übereinanderliegenden Schichten bestehen können.

15

Die Blutabtrennung mit Mitteln gemäß Fig. 3a, 3b, 4 und 6 läßt sich wesentlich verbessern, wenn man auf die Glasfaser 3 neben oder in der Reaktionsschicht 1 eine hydrophobe Barriere 15 aufbringt, die teilweise in das Volumen der Glasfaser 3 hineinragt. Die Fig. 3 c, 3 d, 6 a und 6 b zeigen diese Barriere 15 und entsprechen im übrigen dem Aufbau gemäß Fig. 3, 4 und 6. Diese Barriere 15 verhindert nicht nur, daß sich Blut 8 an der Oberfläche der Glasfaser zuerst ausbreitet und den Indikatorbezirk verunreinigt, sie verbessert auch entscheidend die Trennwirkung der Glasfaser. Es kann deshalb mit relativ kleinen Glasfaserpapieren 3 gearbeitet werden, was zur Folge hat, daß wesentlich kleinere Blutmengen benötigt werden. Die Barriere kann auf herkömmliche Weise, z.B. aus Düsen oder mit Rädern aufgebracht werden. Das hydrophobe Material für die Barriere kann z.B. ein Schmelzkleber oder ein herkömmlicher Lösungsmittelkleber oder Wachs sein.

35

Desweiteren beschreibt Fig. 9 den Aufbau einer erfindungs-
gemäßen Form, die Plasma von den Erythrozyten des Voll-
blutes ohne Zentrifugieren abtrennt und für diagnostische
Zwecke bereitstellt. Dazu wird ein Rohr oder ein Gefäß 13,
das z.B. die beschriebene Form hat, mit den oben be-
schriebenen Glasfasern 14 gefüllt. Das Blut 8 wird oben in
das Gefäß eingefüllt. Auf dem Weg nach unten wird nun
durch die Glasfasern das Plasma von den Erythrozyten des
Blutes abgetrennt. Das sich im unteren Teil des Gefäßes 13
sammelnde Plasma kann nun z.B. durch eine "end-to-end"-
Kapillare aufgenommen oder abgesaugt werden und direkt
einem anderen diagnostischen Verfahren zugeführt werden.

Einen anderen erfindungsgemäßen Aufbau beschreibt die
Fig. 10, wobei das zur Abtrennung der Erythrozyten geeig-
nete Gefäß 13 die Form einer Kolbenspritze aufweisen kann,
die im unteren Teil mit Glasfasern 14 dicht gefüllt ist.
Das Blut⁸ wird in das oben offene Gefäß eingebracht. Nach
erfolgter Trennung von Erythrozyten und Plasma, wobei
das Plasma sich im unteren Gefäßteil sammelt, kann durch
Einführen und vorsichtiges Drücken des Kolbens 17 zuerst
das Plasma aus dem Spritzenkörper herausgedrückt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Plasma-Gewinnung kann,
wie in Fig. 11 beschrieben, auch mit einem Gefäß 15 durch-
geführt werden, das durch ein in einer Richtung durchläs-
siges Ventil 16 in zwei Teile getrennt ist und mit den oben
beschriebenen Glasfasern gefüllt ist. Das Blut 8 wird oben
in das Gefäß eingefüllt. Das Plasma sammelt sich nach der
Abtrennung von den Erythrozyten im unteren Teil des Gefäßes
und kann nun durch Zusammenpressen des unteren Gefäßteiles
entleert werden. Dabei verhindert das Ventil 16, daß das

Plasma in den oberen, die Blutzellen enthaltenden Teil zurückströmt.

Weiterhin kann das erfindungsgemäße Verfahren mit einer Anordnung durchgeführt werden, die durch Fig. 1 beschrieben wird, wobei die auf die Unterlage 2 geklebte Reaktionsschicht 1 aus einem definiert saugenden Material besteht, so daß beim Auftragen von Blut ein definiertes Plasmavolumen in die Schicht 1 gelangt. Nach dem Abtrennen der Schichten 3, 4 und 5 kann das Plasma, d.h. die zu analysierende Substanz durch ein Lösungsmittel eluiert werden. Die Elution des Plasmas und die Analyse kann sofort, aber auch - je nach zu analysierender Substanz - zu einem späteren Zeitpunkt an anderem Ort durchgeführt werden. Falls die Analyse erst später durchgeführt werden soll, kann es vorteilhaft sein, das Plasma zunächst, beispielsweise mit warmer Luft oder durch Gefrieretrocknen, einzutrocknen. Es ist weiterhin möglich, getrennt von dem Bezirk für das Aufbringen der Probe, einen oder mehrere Bereiche vorzusehen, die Reagenzien enthalten, so daß beim Eluieren mit einem Lösungsmittel das ganze Reaktionsgemisch gleichzeitig eluiert wird.

Wenn die Reaktionsfarben nicht nur visuell ausgewertet werden sollen, sondern in Remissionsphotometern gemessen werden sollen, ist es zweckmäßig, die Reaktionsschicht 1 mit einer Abdeckschicht 7 zu bedecken, um eine Verschmutzung der Meßanordnung zu vermeiden. Ist die Reaktionsschicht 1 ein Film etwa gemäß DE-OS 29 10 134 oder DE-PS 15 98 153, so ist es zweckmäßig diese direkt auf die Abdeckschicht 7 zu beschichten und dann beide gemeinsam zu montieren. Eine mögliche Ausführungsform zeigt Fig. 3 e. Naturgemäß ist die Abdeckschicht 7 auch anwendbar auf andere Ausführungsformen,

wie es in Fig. 7 a gezeigt ist, die im übrigen dem Aufbau gemäß Fig. 7 entspricht.

Es hatte sich weiterhin als vorteilhaft erwiesen, Anordnungen zu wählen, bei dem die Reaktionsschicht 1 zunächst nicht mit der Glasfaser 3 bzw. der saugfähigen Schicht 9 in flüssigkeitsleitender Berührung ist, sondern daß diese Berührung erst dann herbeigeführt wird, wenn sich die genannten Schichten vollständig mit Plasma bzw. Serum gefüllt haben. Die Vorteile dieser Anordnungen sind, daß das Plasma bzw. Serum mit der Reaktionsschicht 1 zu einem vorher bestimmbaren exakten Zeitpunkt in Berührung gebracht werden können. Ferner erfolgt diese Berührung über die ganze Fläche, so daß Chromatographieeffekte, wie sie bei den vorstehenden Anordnungen gegebenenfalls auftreten können, ausgeschlossen sind. Die Tatsache, daß zwischen Aufgeben des Blutes 8 und Beginn der Reaktion in der Reaktionsschicht 1 eine vorher bestimmbare Zeit gelegt werden kann, ist von großer Bedeutung bei Reaktionen die unter besonders kontrollierten Bedingungen ablaufen müssen. So kann bei der Bestimmung von Enzymen, die bei besonders konstanter Temperatur ablaufen muß, die Reaktion erst gestartet werden, wenn das diagnostische Mittel hinreichend konstant temperiert ist. Ebenso können in den Zonen von 3 und 9, in denen sich das Plasma sammelt, Reagenzien untergebracht werden, die den nachzuweisenden Stoff in zeitabhängiger Reaktion in einen bestimmten Zustand bringen, d.h. eine Vorreaktion ablaufen lassen. Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung der Creatin-Kinase mit N-Acetylcystein.

Fig. 12, 13 und 14 beschreiben verschiedene mögliche Anordnungen, wobei in Fig. 13 die hydrophobe Barriere 15 gleichzeitig als Befestigung der Schichten 1 und 7 dient. Die Bezeichnungen und Zusammensetzungen der übrigen Schichten entsprechen den Fig. 3 bis 6.

In Fig. 14 ist die Verwendung eines hydrophoben Netzes 18 zwischen Reaktionsschicht 1 und Glasfaser 3 bzw. Saugschicht 9 beschrieben. Dieses hydrophobe Netz schützt die Anordnung vor unbeabsichtigtem leichtem Berühren und läßt den Flüssigkeitskontakt erst bei stärkerem Anpressen eintreten. Dies trägt zu einer verbesserten Praktikabilität bei.

Naturgemäß ist es möglich, daß die Reaktionsschicht 1 aus 2 oder mehreren voneinander verschiedenen Bezirken bestehen kann. Diese können entweder die gleiche Substanz in verschiedenen Konzentrationsbereichen oder aber verschiedene Substanzen nachweisen, wenn die Rezepturen entsprechend ausgewählt sind. Ferner sind auch Anordnungen denkbar, bei denen gleichzeitig verschiedene Reaktionsschichten von dem Plasma, das aus einer Auftropfstelle herrührt, benetzt werden. Es sind hier die verschiedensten Formen denkbar, längliche, kreisförmige und dergleichen.

In Fig. 15 a bis 17 b sind einige mögliche Anordnungen dargestellt, wobei die verschiedenen Testbezirke mit 1 a bis 1 d unterschieden wurden und die übrigen Bezeichnungen den vorstehenden Fig. entsprechen.

Die Blutabtrennung kann gleichfalls verbessert werden, wenn auf der Glasfaser 3 an der Blutauftropfstelle noch ein weiterer Glasfaserbezirk 3 a aufgebracht wird. Hierbei kann 3 a und 3 aus dem gleichen Material bestehen, es kann aber auch für 3 a ein Material anderer Dicke, bzw. mit anderem Faserdurchmesser gewählt werden. Fig. 18 und 19 zeigen mögliche Anordnungen, die im übrigen den Fig. 5 und 12 entsprechen.

In den folgenden Beispielen soll die Erfindung näher erläutert werden:

Beispiel 1

Cholesterin-Teststreifen

5 0,117 g Methylhydroxypropylcellulose
 (Culminal MHPC 8000)
 7,000 g Titandioxid
 0,138 g KH_2PO_4
 0,479 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 3400 U Cholesterinesterase
10 5000 U Cholesterinoxidase
 $7 \cdot 10^4$ U Peroxidase
 0,476 g Nat-riumdioctylsulfosuccinat

15 werden in 70 ml Wasser gelöst. Dann werden nacheinander

 14,0 g Cellulose
 8,4 g Polyvinylpropionat-Dispersion

20 homogen eingearbeitet. Zuletzt wird

 0,66 g 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin gelöst in
 1,6 ml Aceton

25 zugegeben. Dieser Ansatz wird etwa 300 μ dick auf eine
 glatte Kunststoffolie beschichtet und nach dem Trocknen bei
 60° C - 70° C in 6 mm breite Streifen geschnitten. Diese
 Streifen werden anschließend zusammen mit einem 60 μ star-
 ken Netzwerk aus Nylon und einem ebenfalls in 6 mm breite
 Streifen geschnittenen Glasfaserpapier (Glasfaserfilter
30 Nr. 3362 von Schleicher & Schüll., Papierdicke 0,47 mm,
 Dichte 0,27 g/cm³, mittlerer Faserdurchmesser ca. 2,5 μ)
 auf eine Polyesterfolie geklebt. Anschließend wird sie in
 6 mm breite Streifen zerschnitten.

Betüpfelt man die Oberseite des Teststreifens mit 40 μ l Blut und entfernt nach 1 Minute das Glasfaserpapier mit dem restlichen Blut zusammen mit dem Netzwerk durch Abreißen, dann bildet sich innerhalb von 3 Minuten auf dem Testbezirk eine Reaktionsfarbe, die derjenigen entspricht, die man erhält, wenn anstelle des Blutes mit dem abzentrifugierten Plasma des gleichen Blutes getüpfelt wird.

Beispiel 2

Cholesterin-Test

0,45	g	KH_2PO_4
1,55	g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
$1,5 \times 10^4$	U	Cholesterinesterase
1×10^4	U	Cholesterinoxidase
3×10^5	U	Peroxidase
2,0	g	Na-Dioctylsulfosuccinat
6,9	g	Natrium-Alginat (Algipon)

werden in 250 ml Wasser gelöst, dann werden noch

2,0 g 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

gelöst in 15 ml Aceton dazugegeben. Anschließend werden noch

20,0 g Kieselgur

homogen verteilt. Diese Reaktionsmasse wird in 6 mm breiten Streifen mit einer Siebdruckmaschine (Gewebe : 190 μ) auf ein Glasfaserpapier (z.B. das Glasfaserfilter Nr. 85/90 von

Macherey, Nagel & Co.) in der im Beispiel 1 beschriebenen Form aufgebracht. Das bedruckte Glasfaserpapier wird bei 60° C - 80° C getrocknet und so in 12 mm breite Streifen geschnitten, daß die bedruckte Reaktionszone die eine Hälfte des Streifens ausmacht. Dieser Streifen wird auf das Ende einer Polyesterfolie geklebt und diese quer zu den Glasfaserpapieren geschnitten. Wenn nun auf die der Reagenzschicht abgewendeten Kante des unbeschichteten Glasfaserpapiers 40 µl Blut aufgetropft werden, diffundiert das Plasma unter die Reaktionszone. Diese nimmt in Abhängigkeit von der Cholesterinkonzentration des Blutes eine unterschiedlich stark gefärbte blaue Reaktionsfarbe an. Die Intensität der Reaktionsfarbe entspricht derjenigen, die man erhält, wenn man anstelle des Blutes mit dem aus dem gleichen Blut gewonnenen Serum oder Plasma tüpfelt. In gleicher Weise können auch die in der folgenden Tabelle 1 aufgeführten Papiere verwendet werden.

Tabelle 1

Glasfaserfilterpapiere zur Plasmaabtrennung

Hersteller	Typ	Faser- durch- messer	mittl. Faser- durch- messer		Flächen- gewicht, (g/m ²)	Papier	
			(µ)	(µ)		Dicke, (µm)	Dichte (g/cm ³)
Machery & Nagel	85/90 BF	2-9	3,2		87	350	0,249
Nuclepore	P 300	1-3	1,5		25	89	0,275
Schleicher & Schüll	Nr. 9	3-4	3,4		67	269	0,247
Schleicher & Schüll	3362	1-7	2,5		127	472	0,269

Beispiel 3

Cholesterintest

Eine Reagenzienmasse, bestehend aus

5	16,0 g	Cellulose M+N Ac 10
	86,0 g	einer 0,2 %igen Lösung von Methylhydroxypropylcellulose (Culminal MHPC 8000)
	0,32 g	Netzmittel (Marlon)
10	0,68 g	Netzmittel (Na-Dioctylsulfosuccinat)
	12,0 g	Polyvinylpropionat-Dispersion (Propiofan 70 D)
	0,48 g	Tetramethylbenzidin
	10,0 g	Titandioxid
15	9600 U	Cholesterinesterase
	7200 U	Cholesterinoxidase
	$1,04 \times 10^4$ U	Peroxidase
	0,01 g	Gallussäure

20 wird in einer Dicke von 0,2 mm auf ein hydrophobes Polyester-
estervlies (Reemay 2033 von Du Pont) beschichtet und bei
60° C getrocknet. Anschließend werden ein 6 mm breiter
Streifen dieser Beschichtung und ein 12 mm breiter Strei-
fen eines Glasfaserfilters (z.B. das Filter 3362 von
25 Schleicher & Schüll) so nebeneinander auf einen festen
Plastikstreifen geklebt, daß das Glasfaserfilter sehr eng
an das beschichtete Vlies anstößt. Wenn von diesem Plastik-
streifen quer 6 mm breite Streifen abgeschnitten werden,
dann erhält man Teststreifen, bei denen nach Auftropfen
30 von ca. 50 µl Vollblut auf die vom Reagenzienvlies ent-
fernte Seite des Glasfaserfilters nach kurzer Zeit nur
reines Plasma in das Reagenzienvlies übertritt und zu
einer blauen Reaktionsfarbe führt, deren Intensität mit
der Konzentration des Cholesterins im Blut zunimmt.

35

Beispiel 4

Separate Plasmagewinnung

5

Ein sich nach unten konisch verjüngendes Kunststoffgefäß
(die Kunststoffspitze einer Kolbenhubpipette, Länge 5 cm,
Dicke 0,5 cm) wird zu 2/3 mit Glasfasern gemäß der folgenden
Tabelle 2 locker gefüllt, wobei Schüttdichten von 0,1 - 0,4
10 g/cm³ erhalten werden. Nachdem der obere freie Teil mit Blut
gefüllt wurde, diffundiert das Serum in die Gefäßspitze.

10

Von dort kann eine "end-to-end"-Kapillare mit 15 µl Inhalt
durch Heranführen an die Pipettenspitzenöffnung gefüllt
werden. Das auf diese Weise gewonnene Plasma kann nun direkt
15 jedem beliebigen analytischen Verfahren zugeführt werden.

15

Tabelle 2

Untersuchung des Trennvermögens verschiedener Glasfasern in einem Versuchsaufbau nach Beispiel 4
 Glasfasern: Eigenschaften, Trennvermögen Erythrozyten/Plasma

Johns-Manville USA	VEB Trisol DDR	Durchmesser (µm) Bereich (X)	Mittelwert	Faserlänge µm	Oberfläche m ² /g	Trennung Erythrozyten/Plasma
100		0,2 - 0,29	0,25	300	5,1	+
102		0,3 - 0,33	0,32		4,5	+
104		0,34 - 0,48	0,4	800	3,12	+
106		0,49 - 0,58	0,54	1000	2,6	+++
	U 60	0,51 - 0,64	0,58		-	++
108 A		0,59 - 0,88	0,74	1200	1,72	++
	U 70	0,65 - 0,76	0,71			++
	U 80	0,77 - 0,93	0,85			+++
	U 90	0,94 - 1,19	1,07			++
	U 100	1,2 - 1,44	1,32			+++
108 B		0,89 - 2,16	1,53		0,71	+++
	U 156	1,45 - 2,49	1,97		-	+
110		2,17 - 3,10	2,6		0,49	-
112		2,6 - 3,8	3,2	1900	0,40	-
	F	2,5 - 4,0	3,3			-

+ befriedigend ++ gut +++ sehr gut - negativ

(X) 80% der Fasern liegen in diesem Bereich

Effekte einer hydrophoben Barriere

5

Zur Verdeutlichung der Effekte einer hydrophoben Barriere

15 , wurden Vorrichtungen gemäß Figur 14 hergestellt, die
aus einer durchsichtigen Polycarbonat-Trägerfolie 2 von
6 mm Breite und 0,3 mm Dicke, einer 9 x 6 mm großen saug-
fähigen Schicht 9 aus 0,09 mm dickem Glasfaserpapier,
10 einem hydrophoben Nylonnetz 18 von 0,075 mm Dicke und
einer transparenten Abdeckfolie 7 abgedeckt sind.
In saugfähigem Kontakt mit der Schicht 9 ist ein Glas-
faserpapier 3 auf dem Träger befestigt, das aus Glas-
faserpapier (Schleicher & Schüll, Nr. 3362, Dicke 0,47 mm)
15 von 6 mm Breite und der in der folgenden Tabelle angegebenen
Länge besteht. Jeweils eine Hälfte dieser Vorrichtungen
wird an der Berührungsstelle zwischen den Schichten 3, 9
und 18 mit einer etwa 2 mm breiten 0,1 mm dicken Barriere
20 15 aus Paraffinwachs versehen.

Zur Ermittlung der Plasmagewinnung werden auf die Mitte
des Glasfaserpapiers 3 die in der folgenden Tabelle 3
angegebenen Blutmengen aufgetragen und nach 30 Sekunden
25 die Benetzung der saugfähigen Schicht 9 sowie gegebenen-
falls eine Übersättigung (Eindringtiefe der Erythrozyten
in die Schicht 9) bestimmt. Die Ergebnisse der Tabelle zeigen,
daß durch die hydrophobe Barriere die Trennung verbessert
und eine vollständige Sättigung erreicht wird, so daß
30 man bereits mit sehr kleinen Blutvolumina, beispielsweise
mit Kapillarblut aus der Fingerbeere, einen solchen Test
durchführen kann. Die Versuche wurden jeweils fünffach
durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

35

Tabelle 3

Abmessungen des Glasfaser- vlases (3)	getipfeltes Blutvolumen (μ l)	%uale Benetzung der Schicht 9 mit Hydrophob-Barriere		%uale Benetzung der Schicht 9 ohne Hydrophob-Barriere	
		Plasma $\bar{X} n = 5$	Blut $\bar{X} n = 5$	Plasma $\bar{X} n = 5$	Blut $\bar{X} n = 5$
6 x 6 mm	25	88	0	77	12
	30	97	0	72	22
	35	99	0	83	18
7 x 6 mm	29	86	0	82	3
	35	100	0	87	21
	41	100	0	97	31
8 x 6 mm	33	96	0	79	0
	40	100	0	92	0
	47	100	0	100	13

Bezugszeichenliste

- | | |
|----|---|
| 1 | Reaktionsschicht |
| 2 | Unterlage |
| 3 | Glasfaserpapier/Glasfaserschicht/Trennschicht |
| 3a | Glasfaserbezirk |
| 4 | Trennschicht |
| 4a | Griff |
| 5 | Netzwerk |
| 6 | durchlässige Schicht |
| 7 | durchsichtige Abdeckschicht |
| 8 | Bluttropfen/Blut |
| 9 | saugfähiges Material/Schicht |
| 11 | Löcher |
| 12 | vorgefertigte Form |
| 13 | Gefäß |
| 14 | Glasfasern |
| 15 | hydrophobe Barriere |
| 16 | Ventil |
| 17 | Kolben |
| 18 | hydrophobes Netz |

A n s p r ü c h e

1. Mittel zur Abtrennung von Plasma oder Serum aus Vollblut, bestehend aus einer Schicht aus Glasfasern mit einem mittleren Durchmesser von $0,2 - 5\mu$, vorzugsweise $0,5 - 2,5\mu$, insbesondere $0,5 - 1,5\mu$ und einer Dichte von $0,1 - 0,5 \text{ g/cm}^3$, wobei das Volumen des abzutrennenden Plasmas oder Serums höchstens 50 %, vorzugsweise weniger als 30 % vom Saugvolumen der Glasfaserschicht beträgt.
5
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß den Glasfasern synthetische organische Fasern beigemischt oder diese durch anorganische oder organische Bindemittel verfestigt bzw. miteinander verklebt sind.
10
3. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Glasfasern in einer Säule geschichtet sind und am Kopf der Säule die Aufgabe für das Blut und am Ende die Abnahme für das Plasma vorgesehen ist.
15
4. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß unterhalb der Glasfaserschicht ein Ventil und darunter ein Zwischenspeicher für das Plasma vorgesehen ist, aus dem das Plasma durch Komprimieren ausgetrieben werden kann.
20
5. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Glasfaserschicht aus einem Glasfaserpapier oder Glasfaservlies besteht und Teil eines diagnostischen Mittels für den Nachweis von Inhaltsstoffen des Plasmas ist.
25
30
6. Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Glasfaserschicht die oberste Schicht eines mehr-
35

schichtigen diagnostischen Mittels ist, welches auf einem inerten Träger befestigt ist.

- 5 7. Mittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nachweisreaktion in der untersten Schicht abläuft und durch den Träger analysiert wird.
- 10 8. Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Glasfaserschicht und gegebenenfalls weitere Schichten über eine ablösbare Schicht mit der Reaktionsschicht verbunden sind und nach dem Durchtreten des Plasmas bzw. nach Ablauf der Reaktion mit der ablösbaren Schicht zusammen entfernt werden.
- 15 9. Mittel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die ablösbare Schicht ein Netzwerk ist, welches neben der Reaktionsschicht mit dem Träger verbunden ist.
- 20 10. Mittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionsschicht auf einem Teilbereich der Glasfaserschicht in saugfähigem Kontakt aufgeklebt oder aufgedruckt ist und das Blut auf den anderen Teilbereich aufgebracht wird.
- 25 11. Verfahren zum Abtrennen von Plasma oder Serum aus Vollblut, dadurch gekennzeichnet, daß man das Blut langsam durch eine Schicht aus Glasfasern mit einem mittleren Durchmesser von $0,2 - 5,0 \mu$ und einer Dichte von $0,1 - 0,5 \text{ g/cm}^3$ sickern läßt und das ablaufende Plasma gewinnt, wobei das Volumen des abzutrennenden Plasmas oder Serum höchstens 50 %, vorzugsweise weniger als 30 30 % vom Saugvolumen der Glasfaserschicht beträgt.
- 35 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man das ablaufende Plasma direkt in ein diagnostisches

- 25 -

Mittel einbringt.

- 5 13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß
man das ablaufende Plasma in einem saugfähigen Träger
auffängt und trocknet und zum Nachweis der Inhalts-
stoffe eluiert.

10



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl. 3)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
D	<u>FR - A - 2 419 058</u> (ASAHI KASEI KOGYO) * Seite 3, Zeilen 7-39; Seite 4, Zeilen 1-26; Seite 7, Zeilen 1-13 * & DE - A - 2 908 721 ---	1,2	
A	<u>FR - A - 2 430 784</u> (DOMNICK HUNTER ENGINEERS) * Seite 1, Zeilen 1-5, 24-29 * ---	1	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl. 3)
A	<u>US - A - 3 983 005</u> (CHARLES T. GOODHUE) * Zusammenfassung; Spalte 12, Zeilen 22-39 * & DE - A - 2 512 586 ---	5-7	
A	<u>DE - A - 2 934 760</u> (FUJI PHOTO FILM) * Patentansprüche 1-11, 15 * ---	1,5	
A	<u>DE - A - 2 118 455</u> (BOEHRINGER) * Patentansprüche 1,6; Spalte 2, Zeilen 50-60; Spalte 3, Zeilen 5-30 * -----	9	

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
X/D	<p><u>DE - A - 2 922 958</u> (FUJI PHOTO FILM)</p> <p>* Patentansprüche 1,2; Seite 1, Zeilen 1-13; Seite 4, Zeilen 9-29; Seite 5, Zeilen 1-24; Seite 8, Zeilen 23-31; Seite 9, Zeilen 1-23; Seiten 10-17 *</p> <p>---</p> <p><u>DE - B - 2 356 353</u> (B. BRAUN MELSUNGEN A.G.)</p> <p>* Patentanspruch 1; Spalte 4, Zeilen 50-65; Spalte 5, Zeilen 21-32; Beispiele 1 und 2 *</p> <p>---</p>	<p>1-13</p> <p>1,2</p>	<p>G 01 N 33/48 33/52 A 61 K 35/14 C 12 Q 1/00 B 01 L 3/14 B 01 D 39/20</p>
D	<p><u>DE - A - 2 222 951</u> (GEOMET INC.)</p> <p>* Seite 3, Zeilen 1-26; Patentanspruch 1 *</p> <p>---</p> <p><u>US - A - 3 791 933</u> (RUDOLPH H. MOYER)</p> <p>* Zusammenfassung; Beispiel 4; Patentansprüche 1 und 10 *</p> <p>---</p>	<p>1-3, 12</p> <p>1-13</p>	<p>RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.)</p> <p>B 01 L 3/14 G 01 N 33/16 33/48 33/50 33/52 C 12 Q 1/00 1/32 1/52 1/60 1/62 B 01 D 39/00 39/06</p>
D	<p><u>FR - A - 2 419 073</u> (ASAHI KASEI KOGYO)</p> <p>* Seite 2, Zeilen 30-36; Seite 3, Zeilen 2-13; Seite 4, Zeilen 35-38; Seite 5, Zeilen 27-38; Seite 7, Zeilen 34-38; Seite 11, Zeilen 24-38 *</p> <p>& DE - A - 2 908 722</p> <p>---</p>	<p>1-3</p>	<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X: von besonderer Bedeutung A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: kollidierende Anmeldung D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.</p>			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
Den Haag	29.10.1981	DE LUCA	

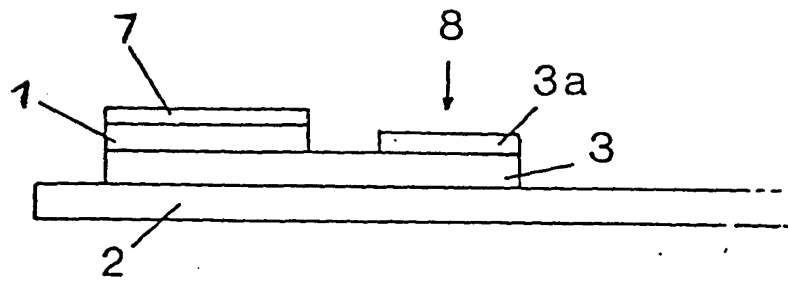
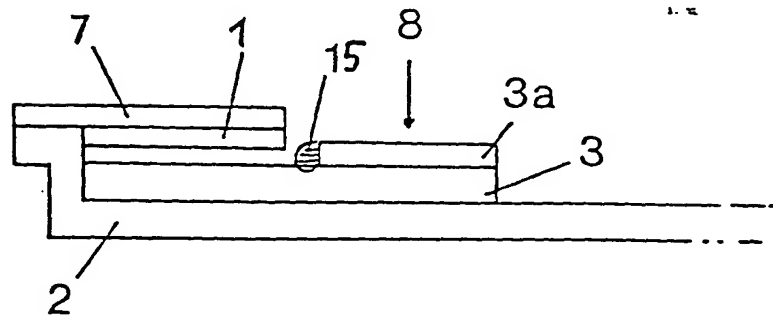
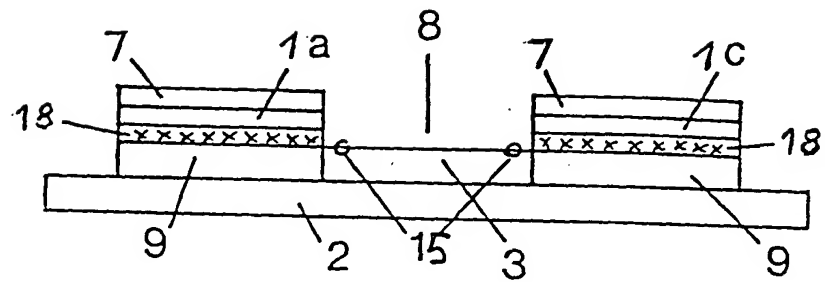
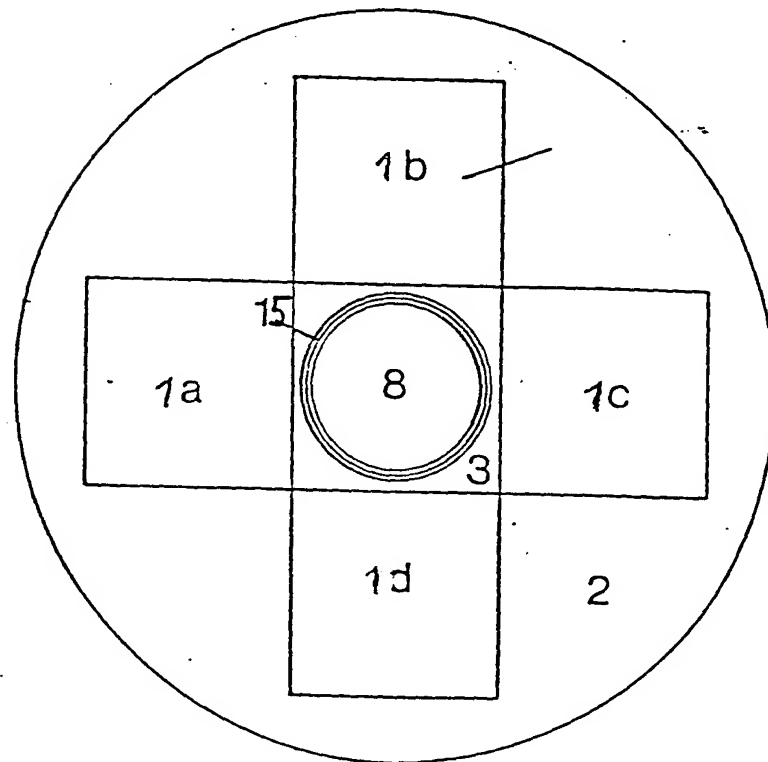
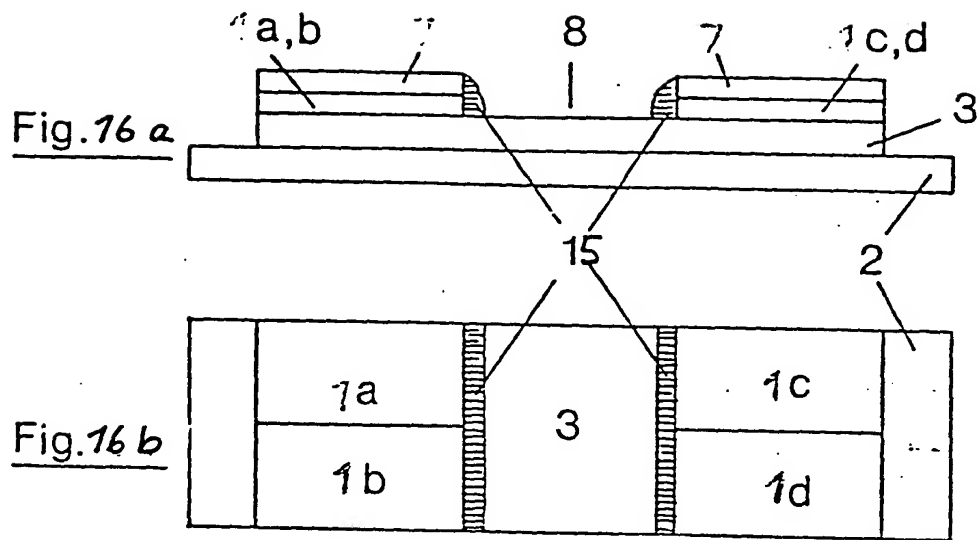
Fig. 18Fig. 19

Fig. 17aFig. 17b



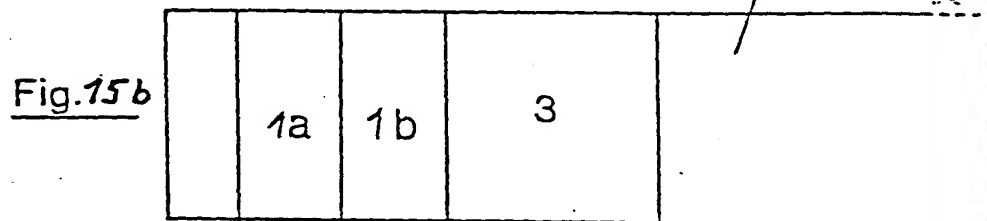
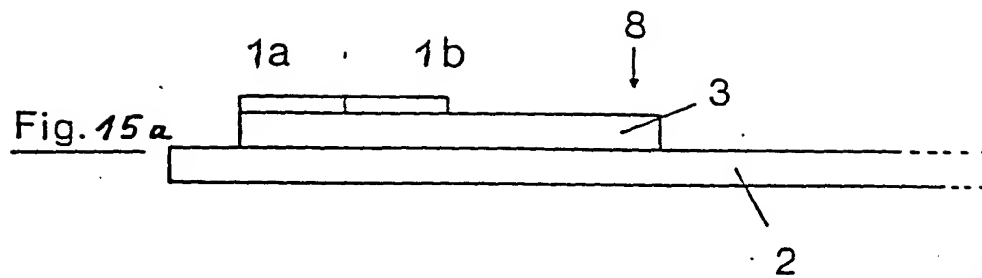
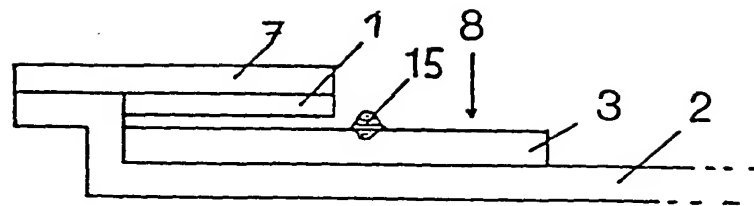
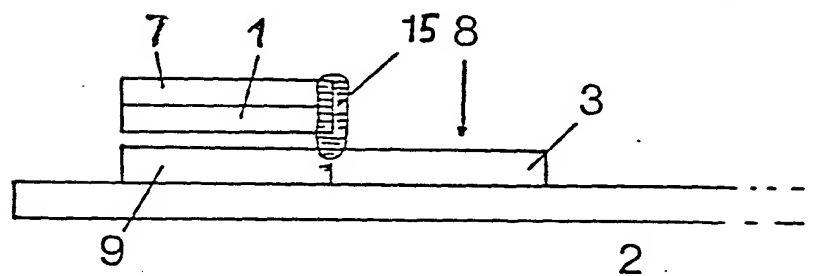


Fig.12Fig.13Fig.14